

15/15 - (C) FILE CAPLUS

STN CA Caesar accession number : 1826

AN - 1978:191467 CAPLUS

DN - 88:191467

TI - N.alpha.-Acyl-.alpha.-L-amino acid anilides

IN - Baba, Yoshihiko; Yabe, Yuichiro; Minato, Sadamasa

PA - Sankyo Co., Ltd., Japan

SO - Jpn. Kokai Tokkyo Koho, 5 pp.

CODEN: JKXXAF

DT - Patent

LA - Japanese

FAN.CNT 1

PATENT NO.	KIND	DATE	APPLICATION NO.	DATE
------------	------	------	-----------------	------

PN - JP52148032	A2	19771208	JP 1976-63785
-----------------	----	----------	---------------

9760601

JP58026745B	B4	19830604
-------------	----	----------

PRAI- JP 1976-63785	19760601
---------------------	----------

IT - 66253-15-4P	
------------------	--

RL: SPN (Synthetic preparation); PREP (Preparation)  
(prepn. of)

RN - 66253-15-4 CAPLUS	
------------------------	--

CN - Carbamic acid,	
---------------------	--

1-[[4-(diethylamino)phenyl]amino]-1-(1H-indol-3-ylmethyl)-2-oxoethyl]-, phenylmethyl ester, (S)- (9CI) (CA
--

INDEX

NAME)

solute stereochemistry.

# PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 52-148032  
(43)Date of publication of application : 08.12.1977

---

(51)Int.CI. C07C103/50.  
C07C102/00  
C07C103/75  
// G01N 33/16

---

(21)Application number : 51-063785 (71)Applicant : SANKYO CO LTD  
(22)Date of filing : 01.06.1976 (72)Inventor : BABA YOSHIHIKO  
YABE YUICHIRO  
MINATO SADAMASA

---

**(54) N-ALPHA-ACYL-ALPHA-L-AMINO ACID**

**(57)Abstract:**

PURPOSE: N $\alpha$ -Acyl- $\alpha$ -L-amino-acid-p-substituted-anilide [R is branched chain of basic- $\alpha$ -L-amino acid or aromatic- $\alpha$ -L-amino acid ; R1 is acyl ; R2 is OH, methoxy, dimethylamino or-diethylamino), e.g. N $\alpha$ -benzyloxy-carbonyl-L-arginine-p-hydroxyanilide.

---

**LEGAL STATUS**

[Date of request for examination]

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of extinction of right]

Copyright (C); 1998,2003 Japan Patent Office

⑨日本国特許庁  
公開特許公報

⑩特許出願公開  
昭52-148032

④Int. Cl<sup>2</sup>  
C 07 C 103/50  
C 07 C 102/00  
C 07 C 103/75 //  
G 01 N 33/16

識別記号

⑤日本分類  
16 C 312.2  
16 C 421  
113 E 6

厅内整理番号  
7430-43  
7248-43  
6904-49

⑥公開 昭和52年(1977)12月8日  
発明の数 1  
審査請求 未請求

(全5頁)

⑦N<sup>α</sup>-アシル-α-L-アミノ酸アミド化  
合物

⑧特 願 昭51-63785  
⑨出 願 昭51(1976)6月1日

⑩発明者 馬場義彦  
東京都品川区広町1丁目2番58  
号 三共株式会社中央研究所内  
同 矢部裕一郎

東京都品川区広町1丁目2番58  
号 三共株式会社中央研究所内

⑪発明者 渡貞正

東京都品川区広町1丁目2番58  
号 三共株式会社醸酵研究所内

⑫出願人 三共株式会社

東京都中央区日本橋本町3丁目  
1番地の6

⑬代理 人 弁理士 横出庄治

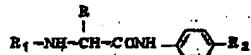
明細書

1. 発明の名称

N<sup>α</sup>-アシル-α-L-アミノ酸アミド化合物

2. 特許請求の範囲

式



(式中、Rは塩基性α-L-アミノ酸又は芳香族α-L-アミノ酸の側鎖の基を示し、R<sub>1</sub>はアシル基を示し、R<sub>2</sub>は水酸基、メトキシ基、ジメチルアミノ基又はジエチルアミノ基を示す)を有するN<sup>α</sup>-アシル-α-L-アミノ酸バラ-置換アミドおよびその酸付加塩。

3. 発明の詳細を説明

本発明は新規なα-L-アミノ酸誘導体に関する、更に詳しくは一般式



(式中、Rは塩基性α-L-アミノ酸又は芳香族α-L-アミノ酸の側鎖の基を示し、R<sub>1</sub>はアシル基を示し、R<sub>2</sub>は水酸基、メトキシ基、ジメチルアミノ基又はジエチルアミノ基を示す)を有するN<sup>α</sup>-アシル-α-L-アミノ酸バラ-置換アミドおよびその酸付加塩に関する。

前記一般式(I)において、塩基性α-L-アミノ酸とはL-リジン、L-アルギニンであり、芳香族α-L-アミノ酸とはL-フェニルアラニン、L-チロシン、L-トリプトファンであつて、その側鎖の基とは4-アミノブチル基、4-クアニノプロピル基、ベンジル基、4-ヒドロキシベンジル基、インドール-3-イルメチル基である。R<sub>1</sub>で示されるアシル基とはアセチル、ベンゾイル、カルボキシプロピオニル、ベンジルオキシカルボニルのような基である。

本発明に係る前記一般式(I)を有する化合物はトリプシンまたはキモトリプシンの優れた基質として使用される。これらの酵素は酵素能の餘

断の指標となるため、これら酵素基質は臨床上有意義を知見を得るに役立つ。

従来、トリプシンおよびキモトリプシンの発色基質としては主としてそれぞれアシル化塩基性アミノ酸ペラニトロアニリド、アシル化芳香族アミノ酸ペラニトロアニリドが使用されていた。しかしながら、これらの化合物は酵素反応を行なうための段階に往々にして難溶であり、安定した測定値を得るための濃度に溶解せらるためには界面活性剤を加えるなど特別な操作を必要とした。

本発明者等は溶解性のよい安定な測定値を得られる化合物について種々研究を重ねた結果、前記一般式(I)を有する化合物が優れた基質であることを見出した。

本発明に係る前記一般式(I)を有する化合物は常法によつて調製することが出来るが、一例をあげると次の通りである。例えはアミノ基を保護された一般式



(1)

(式中、Rは前述した塩基性アミノ酸および芳香族アミノ酸の側鎖の基を示す)を有するアミノ酸を活性化剤の存在下でペラ-位換アニリンと反応させるか、前記一般式(I)を有するアミノ酸のカルボキシル基における反応性誘導体をペラ-位換アニリンと反応させて得られる。使用した保護基が目的とするアシル基の場合はこれまでよいが、目的とするアシル基と異なる場合は一旦これを除去したのち改めて目的とするアシル基を導入するためにアシル化を行なう。また、リジンのように二個のアミノ基を有する場合はペーパー基を選択的除去可能を保護基で保護し、最後にその脱離を行なう。

活性化剤或いは反応性誘導体としては通常のペプチド合成の際に使用し得るものを持て限定なく使用することが出来る。例えはジシクロヘキシルカルボジイミド、カルボニルジイミダゾール等の活性化剤、混合酸無水物、活性エステル

(3)

等の反応性誘導体があげられる。この反応の際のアミノ基の保護基としては後に緩和な条件で除去しうる基で通常のペプチド合成に使用し得る基例えば臭化水素処理、接触還元などで除去し得るベンジルオキシカルボニル基、ヒドロキシジンで除去しうるフタリル基、弱い酸性条件下で除去しうるtert-ブチルカルボニル基、弱い堿性条件下で除去しうるトリプルオキシメチル基等があげられる。保護基を除去された遊離のアミノ酸アニリドには、酸無水物、酸無化物などにより目的とするアシル基を導入する。得られたアシル化アミノ酸アニリドのうち、アシル化塩基性アミノ酸アニリドは所望により常法によつて種々の試験、有機酸による酸竹加塩に変換することが出来る。

酵素活性は、適當な段階にて酵素と基質とを接触させ、酵素反応によつて遊離したペラ-位換アニリンを定量することによつて測定される。

次に実施例および試験例をあげて本発明を更

(4)

に具体的に説明するが、本発明はこれによつて限定されるものではない。

実施例1 N<sup>ε</sup>-ベンジルオキシカルボニル-L-アルギニン 3.08 g をアセトン 30 ml に懸濁させ、これに 6 残基塩酸 5 ml を加えて全溶させる。この溶液を減圧で濃縮乾固し、シロップ状の残渣をジメチルホルムアミド 30 ml に溶かして -20 ℃ に冷却し、N-メチルセルホリシン 101 g を加える。混合物をよく搅拌しながら、これにクロルギ酸エチル 107 g を加え、15 分後にペラ-アミノフェノール 1.2 g を加える。混合物の濃度を 0 ℃ に上げ一夜搅拌を続けた後減圧で濃縮する。シロップ状の残渣に塩化メチレンを加え搅拌して洗い、塩化メチレンを畳漬して除くと目的化合物が得られる。この化合物 0.47 g をシリカゲル [ワコーラル C-200 (商品名)、25 g] を使用したカラムクロマトグラフィー [展開溶剤: クロロホルム-エタノール-酢酸

(5)

-232-

(6)

(20:5:1)で精製し酢酸エチルで結晶化すると融点100~102°Cを有する純品0.35gが得られる。 $[\alpha]_D^{25} = 135^\circ$  (C=11, H<sub>2</sub>O)。

元素分析値 C<sub>20</sub>H<sub>23</sub>O<sub>4</sub>N<sub>6</sub>·CH<sub>3</sub>COOH·1/2H<sub>2</sub>O  
計算値 C, 56.40; H, 6.45; N, 14.95.

実測値 C, 56.51; H, 6.60; N, 14.47.

実施例2 N<sup>6</sup>-ベンジルオキシカルボニル-L-トリブトファン ベラージエチルアミノアニリド

N<sup>6</sup>-ベンジルオキシカルボニル-L-トリブトファン 3.88gをより N<sub>6</sub>-ジエチル-ベラージエニレンジアミン 181gをテトラヒドロフラン50mlに溶かし、氷冷下にジシクロヘキシルカルボジイミド 227gをテトラヒドロフラン5mlに溶かした溶液を加え、0°Cで2時間次いで室温で一夜搅拌する。析出せるジシクロヘキシルウレアを戻去し、戻液を減圧で濃縮すると固体残渣が得られる。これをエタノールから再結晶すると無色針状晶の目的化合物4.27gが得られる。融点189~190°C。

(7)

出する。これを戻取してエタノールから再結晶すると無色針状晶の目的化合物2.0gが得られる。融点190~191°C。 $[\alpha]_D^{25} 405$  (C=10, 0.5規定塩酸)。

元素分析値 C<sub>20</sub>H<sub>23</sub>O<sub>2</sub>N<sub>4</sub>

計算値 C, 70.58; H, 21.9; N, 14.27.

実測値 C, 70.50; H, 22.8; N, 14.15.

実施例4 N<sup>6</sup>-3-カルボキシプロピオニル-L-リジン ベラーメトキシアニリド

a. N<sup>6</sup>-tert-ブトキシカルボニル-N<sup>6</sup>-ベンジルオキシカルボニル-L-リジン ベラーメトキシアニリド

N<sup>6</sup>-tert-ブトキシカルボニル-N<sup>6</sup>-ベンジルオキシカルボニル-L-リジン 4.17gをよりベラーメトキシジン 1.35gをテトラヒドロフラン50mlに溶かし、氷冷下ジシクロヘキシルカルボジイミド 227gをテトラヒドロフラン5mlに溶かした溶液を加え、0°Cで2時間、次いで室温で5時間搅拌する。析出せるジシクロヘキシルウレアを戻去し、戻液を減圧で濃縮し真

元素分析値 C<sub>20</sub>H<sub>23</sub>O<sub>5</sub>N<sub>4</sub>

計算値 C, 71.88; H, 6.66; N, 11.56.

実測値 C, 71.94; H, 6.68; N, 11.64.

実施例5 N<sup>6</sup>-アセチル-L-トリブトファンベラージエチルアミノアニリド

N<sup>6</sup>-ベンジルオキシカルボニル-L-トリブトファン ベラージエチルアミノアニリン 3.4gをメタノール50mlに溶かし、1規定塩酸14mlを加えた後10%ベラジウム-炭素0.5gを使用して接触還元する。2時間後触媒を戻去し、戻液を減圧で濃縮し真で乾固する。残渣をジメチルホルムアミド30mlに溶かし、氷冷下にトリエチルアミン 142gを加え、搅拌しながら無水酢酸 0.71gを加える。0°Cで5時間搅拌した後無水酢酸 0.71gを加え40分搅拌を続ける。不溶物を戻去し、戻液を減圧で濃縮し、残渣を酢酸エチル50mlに溶かす。この溶液を水洗し、無水硫酸ナトリウムで乾燥した後減圧で濃縮し、シロップ状の残渣に少量のエタノールを加えて溶かし、放置すると結晶が析

(8)

空で乾固する。固体残渣をエタノールから再結晶すると無色の針状晶としてこの工程の目的化合物5.5gが得られる。融点167~169°C。

元素分析値 C<sub>20</sub>H<sub>23</sub>O<sub>4</sub>N<sub>4</sub>

計算値 C, 64.31; H, 22.7; N, 8.65.

実測値 C, 64.73; H, 23.9; N, 8.55.

b. N<sup>6</sup>-3-カルボキシプロピオニル-N<sup>6</sup>-ベンジルオキシカルボニル-L-リジン ベラーメトキシアニリド

N<sup>6</sup>-tert-ブトキシカルボニル-N<sup>6</sup>-ベンジルオキシカルボニル-L-リジン ベラーメトキシアニリド 2.5gを50%のトリフルオル酢酸を含む強化メテレン50mlに溶かし、室温で15分搅拌する。減圧で反応混合物を濃縮し、残渣にベンゼン10mlを加えて再び減圧で濃縮し真で乾固する。この操作を2度繰り返した後シロップ状の残渣をジメチルホルムアミド10mlに溶かして氷冷する。混合物にトリエチルアミン 0.49gを次いでコハク酸無水物 0.72gを加えた後40°Cで7時間搅拌する。反応混合

(9)

-233-

(10)

物より減圧で溶剤を留去し、ショット状の残渣に10%クエン酸水溶液を加えて放置すると結晶が析出する。これを戻りし、水、メタノールおよびエーテルで順次洗うとこの工程の目的化合物168gが得られる。融点148~153°C。

元素分析値 C<sub>23</sub>H<sub>31</sub>O<sub>7</sub>N<sub>3</sub>

計算値 C, 61.84; H, 6.44; N, 8.65.

実測値 C, 61.90; H, 6.50; N, 8.55.

c. N<sup>6</sup>-3-カルボキシプロピオニル-L-リジン バラーメトキシアニリド。

N<sup>6</sup>-3-カルボキシプロピオニル-N<sup>6</sup>-ベンジルオキシカルボニル-L-リジン バラーメトキシアニリド168gをメタノール30mlおよび酢酸20mlの混合液に懸濁させ、1mol塩酸5.4mlを加え、10%バラジウム炭素触媒0.5gを加え、1.5時間還元を行なつた後触媒を戻し、戻液を減圧で蒸留する。ショット状の残渣にトリエチルアミン0.5mlを含む粗化メチレン20mlを加え、沈殿を戻りし、塩化メチレン次いでエーテルで洗い真空で乾燥する。

(11)

が得られる。

ここに得られた粉末25gをメタノール70mlおよび水50mlの混合溶媒に懸濁し、6N塩酸2mlを加える。これに5%バラジウム炭素触媒0.25gを加え、2時間接触還元を行なう。触媒を戻し、戻液を蒸留すると若干黒く着色した油状物が得られる。

上記油状物に水50mlを加え、更にテトラヒドロフラン50ml及び重炭酸ナトリウム1.7gを加える。次いでベンゾイルクロロリド0.9gを加え氷冷下でよく搅拌する。2.5時間減圧にてテトラヒドロフランを留去し、析出した粉末を戻りし、メタノールより再結晶すると目的物175gが得られる。融点257~259°C。

[( $\alpha$ )<sub>D</sub><sup>25</sup> + 64] (C = 1.0, 酢酸エチル)

元素分析値 C<sub>23</sub>H<sub>31</sub>O<sub>8</sub>N<sub>3</sub>

計算値 C, 71.44; H, 6.25; N, 10.42.

実測値 C, 71.15; H, 6.15; N, 10.42.

試験例 キモトリップシン活性の測定

N<sup>6</sup>-ベンゾイルチロシン バラーメチル

特開昭52-148032(4)  
する。このものを熱メタノール中で搅拌し、冷却後戻ると目的化合物0.7gが得られる。融点203~204°C。[( $\alpha$ )<sub>D</sub><sup>25</sup> - 545] (C = 1.0, H<sub>2</sub>O)。

元素分析値 C<sub>17</sub>H<sub>25</sub>O<sub>8</sub>N<sub>3</sub> · 1/4 H<sub>2</sub>O

計算値 C, 52.57; H, 7.22; N, 11.81.

実測値 C, 52.52; H, 7.21; N, 11.64.

実施例5 N-ベンゾイル-L-チロシン バラーメチルアミノアニリド

バラーメチルアミノアニリンジ塩酸塩5gをジクロルメタン100mlに懸濁し、トリエチルアミン7.0mlを加えて溶解せしめる。これにN-ベンゾイルオキシカルボニル-L-チロシン4.5gを加え、次いで氷冷下にジシクロヘキシルカルボジイミド5.3gを少量のジクロルメタンに溶かして加える。室温で一夜搅拌し析出したジシクロヘキシルウレアを戻し減圧にて濾過する。残液に酢酸エチルを加え抽出し水洗後無水硫酸ナトリウムで乾燥し減圧濃縮する。残液にイソプロピルアルコールを加えると粉末5.8

(12)

アミノアニリド8.0gをアセトン0.5mlに溶かし、1%のソウイン6.0mlおよび5.0mlの無水塩化カルシウムを含む0.1Mトリス緩衝液(pH 8.0)1.0mlを加えこれを基質緩衝液とする。

基質緩衝液1mlを試験管にとり、37°Cに加温し、結晶キモトリップシン活性(1.5mg/ml H<sub>2</sub>O)0.05mlを加えてインキュベートする。50分後に反応停止基色液(後記)5mlを加え、20分室温で放置した後660nmにおける吸光度を測定する。別に上記操作中キモトリップシン液の代りに水0.05mlを用る以外は全く同様にしてブランク値とする。この両者の差からキモトリップシン活性が得られる。このようにして測定され上記基質に対するキモトリップシンのk<sub>cat</sub>は0.61 ml M<sup>-1</sup> V<sup>-1</sup> max は 0.123 μmole/min. /mgキモトリップシンであつた。

この方法は結晶キモトリップシン液の代りにキモトリップシン活性を有する生体抽出液、血清等にも使用することができた。

反応停止基色液: ナトリウムベンタシアノア

(13)

-234-

(14)

ミノフェロエート 2 g を水 20 mL に溶かし、  
0.3% 過酸化水素水 6.0 mL を加え、更に 1.0  
% 乳酸水素ナトリウム水溶液 2.0 mL を加える。  
この溶液に低分子デキストリン 4 g を加えて  
溶かし呈色液とする。この原液 1 mL に 0.25  
M 乳酸鈉液 (pH 4.5、1% 塩化ナトリウム  
を含む) 5.0 mL を加えて反応停止呈色液とす  
る。

特許出版人 三共株式会社  
代理人弁護士 横出庄尚

(15)